



## DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIEE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS (PCT)

(51) Classification internationale des brevets <sup>6</sup> : <b>C07K 5/103, A61K 38/07</b>	<b>A1</b>	(11) Numéro de publication internationale: <b>WO 96/24612</b>
		(43) Date de publication internationale: <b>15 août 1996 (15.08.96)</b>

(21) Numéro de la demande internationale: **PCT/FR96/00199**(22) Date de dépôt international: **7 février 1996 (07.02.96)**(30) Données relatives à la priorité:  
**95/01490 9 février 1995 (09.02.95) FR**(71) Déposant (pour tous les Etats désignés sauf US): **RHONE-POULENC RORER S.A. [FR/FR]; 20, avenue Raymond-Aron, F-92160 Antony (FR).**

(72) Inventeur; et

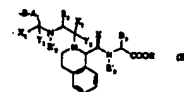
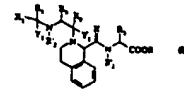
(75) Inventeur/Déposant (US seulement): **CLERC, François [FR/FR]; 35, boulevard Colbert, F-92160 Antony (FR).**(74) Mandataire: **PILARD, Jacques; Rhône-Poulenc Rorer S.A., Direction Brevets, 20, avenue Raymond-Aron, F-92165 Antony Cédex (FR).**(81) Etats désignés: **AL, AM, AU, BB, BG, BR, CA, CN, CZ, EE, FI, GE, HU, IS, JP, KP, KR, LK, LR, LT, LV, MD, MG, MK, MN, MX, NO, NZ, PL, RO, SG, SI, SK, TR, TT, UA, US, UZ, VN, brevet ARIPO (KE, LS, MW, SD, SZ, UG), brevet eurasien (AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), brevet européen (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG).**

Publiée

*Avec rapport de recherche internationale.  
Avant l'expiration du délai prévu pour la modification des revendications, sera republiée si de telles modifications sont reçues.*(54) Title: **NOVEL FARNESYL TRANSFERASE INHIBITORS, PREPARATION THEREOF, AND PHARMACEUTICAL COMPOSITIONS CONTAINING SAME**(54) Titre: **INHIBITEURS DE FARNESYL TRANSFERASE, LEUR PREPARATION ET LES COMPOSITIONS PHARMACEUTIQUES QUI LES CONTIENNENT**

## (57) Abstract

Novel farnesyl transferase inhibitors of general formula (I), preparation thereof, and pharmaceutical compositions containing same. In general formula (I), R<sub>1</sub> is Y-S-A<sub>1</sub>- (where Y is a hydrogen atom, an amino acid residue, a fatty acid residue, an alkyl or alkoxy carbonyl radical, or a radical R<sub>4</sub>-S-, where R<sub>4</sub> is a C<sub>1-6</sub> alkyl radical optionally substituted by a phenyl radical, or a radical of general formula (II), wherein A<sub>1</sub>, X<sub>1</sub>, Y<sub>1</sub>, R<sub>2</sub>, R'<sub>2</sub>, X<sub>2</sub>, Y<sub>2</sub>, X, R<sub>3</sub>, R'<sub>3</sub> and R are as defined below, and A<sub>1</sub> is a C<sub>1-4</sub> alkylene radical optionally  $\alpha$ -substituted in the >C(X<sub>1</sub>)(Y<sub>1</sub>) grouping by an amino, alkylamino, alkanoylamino or alkoxy carbonylamino radical); X<sub>1</sub> and Y<sub>1</sub> are each a hydrogen atom or, taken together with the carbon atom to which they are attached, a >C=O grouping; R<sub>2</sub> is a straight or branched C<sub>1-4</sub> alkyl radical optionally substituted by a cyclohexyl radical; R'<sub>2</sub> is hydrogen or alkyl; X<sub>2</sub> and Y<sub>2</sub> are each a hydrogen atom or, taken together with the carbon atom to which they are attached, a >C=O grouping; R<sub>3</sub> is a C<sub>1-4</sub> alkyl radical optionally substituted by hydroxy, alkoxy, mercapto, alkylthio, alkylsulphinyl or alkylsulphonyl, with the proviso that, when R<sub>3</sub> is an alkyl radical substituted by a hydroxy radical, R<sub>3</sub> may form a lactone with the  $\alpha$ -carboxy radical; R'<sub>3</sub> is hydrogen or alkyl; X is an oxygen or sulphur atom; and R is a hydrogen atom or an optionally substituted alkyl radical or an optionally substituted phenyl radical. These novel products have anticancer properties.



(57) Abrégé

Nouveaux inhibiteurs de farnésyl transférase de formule générale (I), leur préparation et les compositions pharmaceutiques qui les contiennent. Dans la formule générale (I), R<sub>1</sub> représente Y-S-A<sub>1</sub>-(Y = atome d'hydrogène, reste d'acide gras, radical alkyle ou alcoxycarbonyle, ou radical R<sub>4</sub>-S- dans lequel R<sub>4</sub> représente un radical alkyle contenant 1 à 6 atomes de carbone éventuellement substitué par un radical phényle, ou radical de formule générale (II) dans laquelle A<sub>1</sub>, X<sub>1</sub>, Y<sub>1</sub>, R<sub>2</sub>, R'<sub>2</sub>, X<sub>2</sub>, Y<sub>2</sub>, X, R<sub>3</sub>, R'<sub>3</sub> et R sont définis comme ci-après, et A<sub>1</sub> = radical alcoylène contenant 1 à 4 atomes de carbone éventuellement substitué en α du groupement >C(X<sub>1</sub>)(Y<sub>1</sub>) par un radical amino, alkylamino, alcanoylamino, alcoxycarbonylamino), X<sub>1</sub> et Y<sub>1</sub> représentent chacun un atome d'hydrogène ou forment ensemble avec l'atome de carbone auquel ils sont liés un groupement >C=O, R<sub>2</sub> représente un radical alkyle droit ou ramifié contenant 1 à 4 atomes de carbone éventuellement substitué par un radical cyclohexyle, R'<sub>2</sub> représente hydrogène ou alkyle, X<sub>2</sub> et Y<sub>2</sub> représentent chacun un atome d'hydrogène ou forment ensemble avec l'atome de carbone auquel ils sont liés un groupement >C=O, R<sub>3</sub> représente un radical alkyle contenant 1 à 4 atomes de carbone éventuellement substitué par hydroxy, alcoxy, mercapto, alkylthio, alkylsulfinyle ou alkylsulfonyle, étant entendu que, lorsque R<sub>3</sub> représente un radical alkyle substitué par un radical hydroxy, R<sub>3</sub> peut former avec le radical carboxy en α une lactone, R'<sub>3</sub> représente hydrogène ou alkyle, X représente un atome d'oxygène ou de soufre, et R représente un atome d'hydrogène ou un radical alkyle éventuellement substitué ou un radical phényle éventuellement substitué. Ces nouveaux produits présentent des propriétés anticancéreuses.

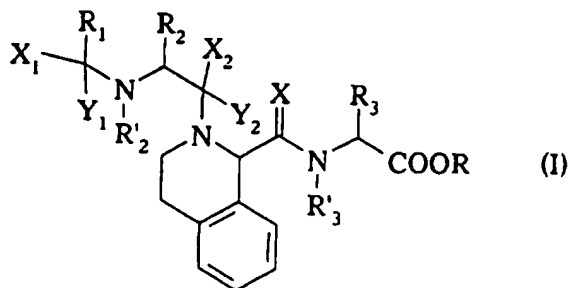
**UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION**

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

AT	Arménie	GB	Royaume-Uni	MW	Malawi
AT	Autriche	GE	Géorgie	MX	Mexique
AU	Australie	GN	Guinée	NE	Niger
BB	Barbade	GR	Grèce	NL	Pays-Bas
BE	Belgique	HU	Hongrie	NO	Norvège
BF	Burkina Faso	IE	Irlande	NZ	Nouvelle-Zélande
BG	Bulgarie	IT	Italie	PL	Pologne
BJ	Bénin	JP	Japon	PT	Portugal
BR	Brsil	KE	Kenya	RO	Roumanie
BY	Bélarus	KG	Kirghizistan	RU	Fédération de Russie
CA	Canada	KP	République populaire démocratique de Corée	SD	Soudan
CF	République centrafricaine	KR	République de Corée	SE	Suède
CG	Congo	KZ	Kazakhstan	SG	Singapour
CH	Suisse	LI	Liechtenstein	SI	Slovénie
CI	Côte d'Ivoire	LK	Sri Lanka	SK	Slovaquie
CM	Cameroun	LR	Libéria	SN	Sénégal
CN	Chine	LT	Lituanie	SZ	Swaziland
CS	Tchécoslovaquie	LU	Luxembourg	TD	Tchad
CZ	République tchèque	LV	Lettonie	TG	Togo
DE	Allemagne	MC	Monaco	TJ	Tadjikistan
DK	Danemark	MD	République de Moldova	TT	Trinité-et-Tobago
EE	Estonie	MG	Madagascar	UA	Ukraine
ES	Espagne	ML	Mali	UG	Ouganda
FI	Finlande	MN	Mongolie	US	Etats-Unis d'Amérique
FR	France	MR	Mauritanie	UZ	Ouzbékistan
GA	Gabon			VN	Viet Nam

## INHIBITEURS DE FARNESYL TRANSFERASE, LEUR PREPARATION ET LES COMPOSITIONS PHARMACEUTIQUES QUI LES CONTIENNENT

La présente invention concerne de nouveaux inhibiteurs de farnésyl  
5 transférase de formule générale :



leur préparation et les compositions pharmaceutiques qui les contiennent.

L'inhibition de la farnésyl transférase et, par conséquent, de la farnésylation  
de la protéine ras, bloque la capacité de la protéine ras mutée à transformer les  
10 cellules normales en cellules cancéreuses.

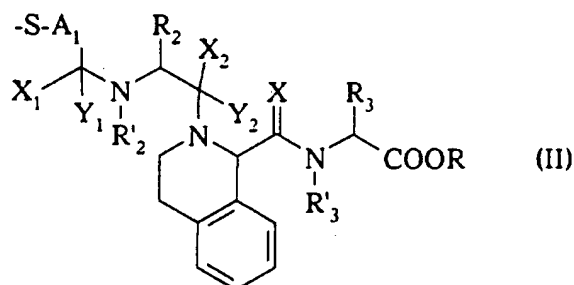
La séquence C-terminale du gène ras contient le motif "CAAX" ou  
"Cys-Aaa<sub>1</sub>-Aaa<sub>2</sub>-Xaa" dans lequel Aaa représente un aminoacide aliphatique et Xaa  
représente un aminoacide quelconque.

Il est connu que des tétrapeptides avec une séquence CAAX peuvent inhiber  
15 la farnésylation de la protéine ras. Par exemple, dans la demande PCT WO 91/16340  
et dans la demande EP 0 461 869 ont été décrits des peptides inhibiteurs de la  
farnésyl transférase Cys-Aaa<sub>1</sub>-Aaa<sub>2</sub>-Xaa qui sont plus particulièrement représentés  
par les peptides Cys-Val-Leu-Ser, Cys-Val-Ile-Met et Cys-Val-Val-Met qui  
manifestent leur activité inhibitrice à des concentrations voisines de 10<sup>-6</sup>M ou  
20 10<sup>-7</sup>M.

Il a maintenant été trouvé, et c'est ce qui fait l'objet de la présente invention,  
que les peptides de formule générale (I) manifestent leur activité inhibitrice (IC<sub>50</sub>) à  
des concentrations de l'ordre de 10<sup>-8</sup>M.

Dans la formule générale (I),  
25 R<sub>1</sub> représente un radical de formule générale Y-S-A<sub>1</sub>- dans lequel Y représente un  
atome d'hydrogène, ou un reste d'acide gras ou un radical  
alkyle ou alkoxy-carbonyle, ou un radical R<sub>4</sub>-S- dans lequel R<sub>4</sub> représente un radical

alkyle contenant 1 à 6 atomes de carbone éventuellement substitué par un radical phényle ou un radical de formule générale :



- dans laquelle  $A_1$ ,  $X_1$ ,  $Y_1$ ,  $R_2$ ,  $R'_2$ ,  $X_2$ ,  $Y_2$ ,  $X$ ,  $R_3$ ,  $R'_3$  et  $R$  sont définis comme
- 5 ci-après, et  $A_1$  représente un radical alcoylène droit ou ramifié contenant 1 à 4 atomes de carbone éventuellement substitué en  $\alpha$  du groupement  $>C(X_1)(Y_1)$  par un radical amino, alkylamino contenant 1 à 4 atomes de carbone, alcanoylamino contenant 1 à 4 atomes de carbone ou alkoxy-carbonylamino dont la partie alkyle contient 1 à 4 atomes de carbone,
- 10  $X_1$  et  $Y_1$  représentent chacun un atome d'hydrogène ou forment ensemble avec l'atome de carbone auquel ils sont liés un groupement  $>C=O$ ,
- $R_2$  représente un radical alkyle droit ou ramifié contenant 1 à 4 atomes de carbone éventuellement substitué par un radical cyclohexyle,
- $R'_2$  représente un atome d'hydrogène ou un radical alkyle droit ou ramifié contenant 1
- 15 à 6 atomes de carbone,
- $X_2$  et  $Y_2$  représentent chacun un atome d'hydrogène ou forment ensemble avec l'atome de carbone auquel ils sont liés un groupement  $>C=O$ ,
- $R_3$  représente un radical alkyle contenant droit ou ramifié contenant 1 à 4 atomes de
- 20 atomes de carbone, mercapto, alkylthio contenant 1 à 4 atomes de carbone, alkylsulfinyle contenant 1 à 4 atomes de carbone ou alkylsulfonyle contenant 1 à 4 atomes de carbone, étant entendu que, lorsque  $R_3$  représente un radical alkyle substitué par un radical hydroxy,  $R_3$  peut former avec le radical carboxy en  $\alpha$  une lactone,
- $R'_3$  représente un atome d'hydrogène ou un radical alkyle droit ou ramifié contenant 1
- 25 à 6 atomes de carbone,
- $X$  représente un atome d'oxygène ou de soufre, et
- $R$  représente un atome d'hydrogène ou un radical alkyle éventuellement substitué par un radical alkoxy contenant 1 à 4 atomes de carbone, alkylthio contenant 1 à 4 atomes de carbone, alkylsulfinyle contenant 1 à 4 atomes de carbone, alkylsulfonyle

contenant 1 à 4 atomes de carbone, phényle, phénoxy, phénylthio, phénylsulfinyle, phénylsulfonyle, alkylamino contenant 1 à 4 atomes de carbone ou dialkylamino dont chaque partie alkyle contient 1 à 4 atomes de carbone, ou un radical phényle éventuellement substitué par un ou plusieurs atomes ou radicaux, identiques ou  
5 différents choisis parmi les atomes d'halogène et les radicaux alkyles, alkoxy, alkylthio ou alcanoyle contenant 1 à 4 atomes de carbone.

Plus particulièrement,

R<sub>1</sub> représente un radical de formule Y-S-A<sub>1</sub>- dans lequel Y représente un atome d'hydrogène ou un reste lysine ou un reste d'acide gras contenant jusqu'à 20 atomes  
10 de carbone et A<sub>1</sub> représente un radical éthylène ou propylène éventuellement substitué par un radical amino,

X<sub>1</sub> et Y<sub>1</sub> représentent chacun un atome d'hydrogène ou forment ensemble avec l'atome de carbone auquel ils sont liés un groupement >C=O,

R<sub>2</sub> représente un radical isopropyle, méthyl-1 propyle, tert-butyle ou  
15 cyclohexylméthyle,

R'<sub>2</sub> représente un atome d'hydrogène ou un radical méthyle,

X<sub>2</sub> et Y<sub>2</sub> représentent chacun un atome d'hydrogène ou forment ensemble avec l'atome de carbone auquel ils sont liés un groupement >C=O,

R<sub>3</sub> représente un radical méthyle ou éthyle substitué par un radical hydroxy, méthoxy, mercapto, méthylthio, méthylsulfinyle ou méthylsulfonyle,  
20

R'<sub>3</sub> représente un atome d'hydrogène ou un radical méthyle,

X représente un atome d'oxygène, et

R représente un atome d'hydrogène ou un radical alkyle contenant 1 à 4 atomes de carbone éventuellement substitué par un radical alcoxy, ou un radical phényle.

25 Plus particulièrement encore,

R<sub>1</sub> représente un radical de formule Y-S-A<sub>1</sub>- dans lequel Y représente un atome d'hydrogène et A<sub>1</sub> représente un radical éthylène ou propylène éventuellement substitué par un radical amino,

X<sub>1</sub> et Y<sub>1</sub> représentent chacun un atome d'hydrogène ou forment ensemble avec  
30 l'atome de carbone auquel ils sont liés un groupement >CO,

R<sub>2</sub> représente un radical isopropyle, méthyl-1 propyle, tert-butyle ou cyclohexylméthyle,

R'<sub>2</sub> représente un atome d'hydrogène,

X<sub>2</sub> et Y<sub>2</sub> représentent chacun un atome d'hydrogène ou forment ensemble avec  
35 l'atome de carbone auquel ils sont liés un groupement >C=O,

R<sub>3</sub> représente un radical méthyle ou éthyle substitué par un radical hydroxy, méthoxy, mercapto ou méthylthio,

R'<sub>3</sub> représente un atome d'hydrogène, et

5 R représente un atome d'hydrogène ou un radical alkyle contenant 1 à 4 atomes de carbone.

Tout particulièrement intéressants sont les produits de formule générale (I) dans laquelle R<sub>1</sub> représente un radical mercapto-2 éthyle ou amino-1 mercapto-2 éthyle, X<sub>1</sub> et Y<sub>1</sub> représentent chacun un atome d'hydrogène ou forment ensemble avec l'atome de carbone auquel ils sont liés un groupement >CO, R<sub>2</sub> représente un  
10 radical isopropyle, X<sub>2</sub> et Y<sub>2</sub> représentent chacun un atome d'hydrogène ou forment ensemble avec l'atome de carbone auquel ils sont liés un groupement >C=O, R'<sub>2</sub> représente un atome d'hydrogène, R<sub>3</sub> représente un radical méthylthio-2 éthyle ou méthylsulfinyle-2 éthyle, R'<sub>3</sub> représente un atome d'hydrogène et R représente un atome d'hydrogène.

15 La présente invention concerne également les formes stéréoisomères des produits de formule générale (I). Les restes des aminoacides représentés par R<sub>1</sub>C(X<sub>1</sub>)(Y<sub>1</sub>), R<sub>2</sub>CH(NR'<sub>2</sub>)[C(X<sub>2</sub>)(Y<sub>2</sub>)] et R<sub>3</sub>CH(NR'<sub>3</sub>)CO-OH ont de préférence la configuration des aminoacides naturels.

20 La présente invention concerne également les sels minéraux ou organiques ainsi que les esters des produits de formule générale (I).

Selon l'invention, les nouveaux produits de formule générale (I) peuvent être obtenus par synthèse en phase solide en utilisant une stratégie de synthèse "9-fluorénylméthoxycarbonyl (Fmoc)". Dans ce cas, les groupements thiols sont protégés par des groupements trityl ou acétamidométhyl, les fonctions amines par des  
25 groupements Boc (t.butoxycarbonyl) et les fonctions acides sous forme d'ester t.butylique, les fonctions alcool par des groupements t.butyl et les fonctions amide et imidazole par des groupements trityl. La synthèse peut être réalisée sur une résine confinée dans des seringues d'extraction en phase solide de 3 cm<sup>3</sup> en polyéthylène haute densité munies de filtres en teflon. Les seringues sont montées sur une vanne à  
30 deux voies en teflon et fermées par un bouchon à ailettes à usage unique en polyéthylène haute densité. L'agitation des seringues est réalisée sur un appareil rotatif pour tubes à hémolyse. Les opérations de lavage et de filtration sont conduites sur une station de travail d'extraction en phase solide.

35 Les synthèses peuvent être réalisées sur 50 µmoles de résine. Les couplages des acides aminés sont réalisés en traitant pendant 1 heure la résine par 250 µmoles

de l'acide aminé convenablement protégé en présence de 250  $\mu$ moles de 2-(1H-benzotriazole-1-yl)-1,1,3,3-tétraméthyluronium, hexafluorophosphate (HBTU), 250  $\mu$ moles de N-hydroxybenzotriazole et 750  $\mu$ moles de diisopropyléthylamine dans 1,2 cm<sup>3</sup> d'un mélange N-méthylpyrrolidone-2 (NMP)/diméthylformamide (1/1 en volumes). La déprotection du groupement FMOC est réalisée par 3 traitements successifs de la résine pendant 2 fois 1 minute puis 20 minutes par 2 cm<sup>3</sup> de pipéridine en solution à 2 % (v/v) dans la NMP.

Par exemple, la Cys-(NMe)Val-[(R,S)-tétrahydro-1,2,3,4-isoquinoléine-1-carbonyl]-Met peut être préparée de la manière suivante :

10 On soumet successivement 50  $\mu$ moles de résine Fmoc-Met [résine de Wang ; Wang *et al.*, J. Amer. Chem. Soc., 95, 1328, (1973)] aux traitements suivants :

- déprotection du groupement FMOC,
- lavage par 5 fois 2 cm<sup>3</sup> de NMP,
- couplage de l'acide Fmoc-(R,S)-tétrahydro-1,2,3,4-isoquinoléine-1-
- 15 carboxylique,
- lavage par 5 fois 2 cm<sup>3</sup> de NMP,
- déprotection du groupement FMOC,
- lavage par 5 fois 2 cm<sup>3</sup> de NMP,
- couplage de la Fmoc-N-méthylvaline,
- 20 - lavage par 5 fois 2 cm<sup>3</sup> de NMP,
- déprotection du groupement FMOC,
- lavage par 5 fois 2 cm<sup>3</sup> de NMP,
- couplage de la Fmoc-cystéine(S-trityl),
- lavage par 5 fois 2 cm<sup>3</sup> de NMP,
- 25 - déprotection du groupement FMOC, puis
- lavage par 5 fois 2 cm<sup>3</sup> de NMP.

La synthèse terminée, les produits sont séparés par traitement de la résine par 10 cm<sup>3</sup> d'un mélange acide trifluoroacétique-phénol-éthanedithiol-thioanisole-eau (40-3-1-2-2 en volumes) pendant 1 heure 30 minutes. La résine est ensuite éliminée par filtration. Le filtrat est concentré sous pression réduite au moyen d'un évaporateur centrifuge (RC10-10 Jouan) équipé d'une pompe à palettes et d'un piège à -90°C pendant 1,5 heures, la température de la chambre d'évaporation étant maintenue à 50°C. Le volume final du concentrat est d'environ 1 cm<sup>3</sup>. Le produit est ensuite précipité par addition de 15 cm<sup>3</sup> d'un mélange de méthyl-tert-butyléther et d'éther de pétrole (2-1 en volumes) puis il est recueilli par centrifugation. Le culot est ensuite

solubilisé dans 1 cm<sup>3</sup> d'acide trifluoroacétique, précipité par addition de 15 cm<sup>3</sup> de méthyl-tert-butyléther puis lavé par 15 cm<sup>3</sup> de méthyl-tert-butyléther. Le produit est ensuite séché sous pression réduite (3,5 kPa). Le produit est enfin purifié par chromatographie liquide à haute performance (HPLC) sur une colonne C<sub>18</sub> 100 Å  
5 (250 x 10 mm, BioRad) éluée par un gradient d'acétonitrile contenant 0,07 % d'acide trifluoroacétique (en volumes) dans l'eau contenant 0,07 % d'acide trifluoroacétique (en volumes) à un débit de 6 cm<sup>3</sup>/min puis lyophilisé. Le produit obtenu est caractérisé par son spectre de masse (electrospray).

L'acide tétrahydro-1,2,3,4-isoquinoléine-1-carboxylique, sous forme  
10 racémique peut être préparé par hydrogénation de l'acide isoquinoléine-1-carboxylique dans les conditions décrites par R.T. Shuman et coll., J. Med. Chem., 36, 314 (1993).

L'introduction du groupement protecteur Fmoc sur un aminoacide est effectuée par action de l'acide chloroformique sur le chloroformiate de 9-fluorénylméthyl  
15 (Fmoc-chlorure) en présence d'une base.

L'activité inhibitrice de la farnésyltransférase et de la farnésylation de la protéine Ras peut être mise en évidence dans le test suivant :

L'activité farnésyltransférase est déterminée par la quantité de (<sup>3</sup>H) farnésyl transférée à partir du (<sup>3</sup>H) farnésylpyrophosphate [(<sup>3</sup>H) FPP] sur la protéine p21  
20 H-ras. Le mélange réactionnel standard est composé, pour un volume final de 60 µl, de Tris-HCl 50mM, MgCl<sub>2</sub> 5mM, dithiotréitol 5 mM, octyl-β-D-glucopyranoside 0,2 %, p21 H-ras 200 picomoles, (<sup>3</sup>H) FPP (à 61000 dpm/picomole) 4,5 picomoles.

La réaction est initiée par addition d'environ 5 ng de farnésyltransférase humaine purifiée à partir de cultures de cellules THP1. Après incubation pendant  
25 20 minutes à 37°C en plaque de microtitration contenant 96 trous de 1 cm<sup>3</sup> par plaque (Titer Plate<sup>®</sup>, Beckman), la réaction est stoppée par addition de 0,4 cm<sup>3</sup> de SDS à 0,1 % dans le méthanol à 0°C. Le mélange est ensuite additionné de 0,4 cm<sup>3</sup> d'acide <sup>®</sup> trichloroacétique (TCA) à 30 % dans le méthanol. Les plaques sont laissées pendant 1 heure dans la glace. Le contenu précipité est alors retenu sur membrane en fibre de<sup>®</sup>  
30 verre Filtermat<sup>®</sup>, Pharmacia) avec l'unité de filtration (Combi Cell Harvester<sup>®</sup>, Skatron) et rincé avec de l'acide trichloroacétique à 6 % dans l'eau distillée. Les membranes sont séchées au four à micro-ondes puis imprégnées de scintillant par fusion sous air chaud de Meltilex<sup>®</sup> (Pharmacia) et enfin comptées en cpm dans un compteur β-Plate<sup>®</sup> (LKB). Chaque essai est répété 3 fois.



L'unité d'activité est définie par 1 picomole de (<sup>3</sup>H) FPP transférée sur p21 H-ras en 20 minutes.

Les pourcentages d'inhibition sont obtenus par comparaison des essais avec et sans inhibiteur après déduction des blancs, les IC<sub>50</sub> étant mesurées à partir des inhibitions obtenues avec 9 concentrations différentes en utilisant les logiciels Enzfitter<sup>®</sup> ou Grafit<sup>®</sup>.

Les résultats obtenus sont rassemblés dans le tableau I.

TABLEAU I

Produit	Activité inhibitrice IC <sub>50</sub>
Cys-(N-Me)Val-[(R,S)-tétrahydro-1,2,3,4-isoquinoléinc-1-carbonyl]-Mct	2,6 x 10 <sup>-8</sup> M

Les nouveaux peptides de formule générale (I) peuvent se présenter sous forme de sels non toxiques et pharmaceutiquement acceptables. Ces sels non toxiques comprennent les sels avec les acides minéraux (acides chlorhydrique, sulfurique, bromhydrique, phosphorique, nitrique) ou avec les acides organiques (acides acétique, propionique, succinique, maléique, hydroxymaléique, benzoïque, fumarique, méthanesulfonique, trifluoroacétique ou oxalique) ou avec les bases minérales (soude, potasse, lithine, chaux) ou organiques (amines tertiaires comme la triéthylamine, la pipéridine, la benzylamine) selon la nature des aminoacides qui constituent le peptide de formule générale (I).

Les nouveaux peptides selon l'invention, qui inhibent la famésyltransférase et la famésylation de la protéine Ras, sont des agents anticancéreux remarquables qui agissent tant au niveau des tumeurs solides que liquides.

La présente invention concerne également les compositions pharmaceutiques qui contiennent au moins un peptide de formule générale (I) en association avec un ou plusieurs diluants ou adjuvants pharmaceutiquement acceptables qu'ils soient inertes ou physiologiquement actifs.

Ces compositions peuvent être administrées par voie orale, parentérale ou rectale.

Les compositions pour administration orale comprennent des comprimés, des pilules, des poudres ou des granulés. Dans ces compositions le produit actif selon l'invention est mélangé à un ou plusieurs diluants inertes tels que saccharose, lactose

ou amidon. Ces compositions peuvent comprendre des substances autres que les diluants, par exemple un lubrifiant tel que le stéarate de magnésium.

Comme compositions liquides pour administration orale peuvent être utilisées des émulsions pharmaceutiquement acceptables, des solutions, des suspensions, des sirops, des élixirs contenant des diluants inertes tel que l'eau ou l'huile de paraffine. Ces compositions peuvent également comprendre des substances autres que les diluants, par exemple des produits mouillants, édulcorants ou aromatisants.

Les compositions selon l'invention pour administration parentérale peuvent être des solutions stériles aqueuses ou non aqueuses, des suspensions ou des émulsions. Comme solvant ou véhicule, on peut employer le propylèneglycol, un polyéthylèneglycol, des huiles végétales, en particulier l'huile d'olive ou des esters organiques injectables par exemple l'oléate d'éthyle. Ces compositions peuvent également contenir des adjuvants, en particulier des agents mouillants, émulsifiants et dispersants. La stérilisation peut se faire de plusieurs façons, par exemple à l'aide d'un filtre bactériologique, en incorporant à la composition des agents stérilisants ou par chauffage. Elles peuvent être également préparées sous forme de compositions solides stériles qui peuvent être dissoutes au moment de l'emploi dans de l'eau stérile ou tout autre milieu stérile injectable.

Les compositions pour administration rectale sont des suppositoires qui peuvent contenir, outre le produit actif, des excipients tels que le beurre de cacao.

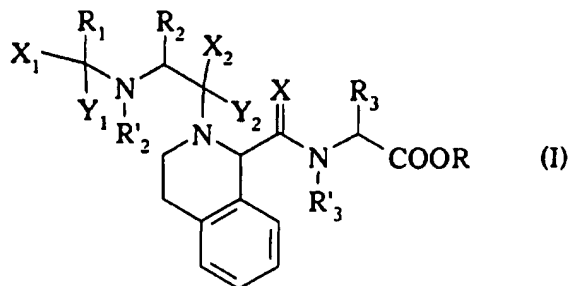
Les compositions selon l'invention sont particulièrement utiles en thérapeutique humaine dans le traitement de cancers d'origines diverses.

En thérapeutique humaine, les doses dépendent de l'effet recherché, de la durée du traitement et des facteurs propres au sujet à traiter.

Généralement, les doses sont comprises, chez l'homme, entre 0,1 et 20 mg/kg par jour par voie intra-péritonéale.

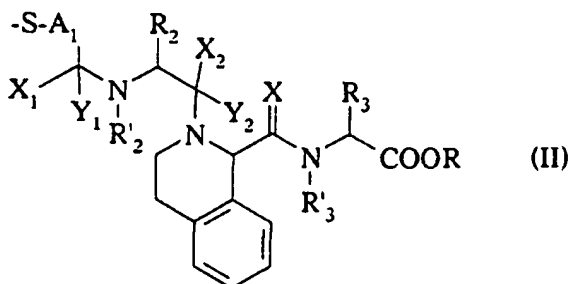
REVENDEICATIONS

1 - Nouveaux peptides de formule générale :



dans laquelle :

- 5 R<sub>1</sub> représente un radical de formule générale Y-S-A<sub>1</sub>- dans lequel Y représente un atome d'hydrogène, ou un reste d'acide gras ou un radical alkyle ou alkoxy-carbonyle, ou un radical R<sub>4</sub>-S- dans lequel R<sub>4</sub> représente un radical alkyle contenant 1 à 6 atomes de carbone éventuellement substitué par un radical phényle, ou radical de formule générale



10

dans laquelle A<sub>1</sub>, X<sub>1</sub>, Y<sub>1</sub>, R<sub>2</sub>, R'<sub>2</sub>, X<sub>2</sub>, Y<sub>2</sub>, X, R<sub>3</sub>, R'<sub>3</sub> et R sont définis comme ci-après, et A<sub>1</sub> représente un radical alcoylène droit ou ramifié contenant 1 à 4 atomes de carbone éventuellement substitué en α du groupement >C(X<sub>1</sub>)(Y<sub>1</sub>) par un radical amino, alkylamino contenant 1 à 4 atomes de carbone, alcanoylamino contenant 1 à 4 atomes de carbone ou alkoxy-carbonylamino dont la partie alkyle contient 1 à 4 atomes de carbone,

15

X<sub>1</sub> et Y<sub>1</sub> représentent chacun un atome d'hydrogène ou forment ensemble avec l'atome de carbone auquel ils sont liés un groupement >C=O,

20

R<sub>2</sub> représente un radical alkyle droit ou ramifié contenant 1 à 4 atomes de carbone éventuellement substitué par un radical cyclohexyle,

R'<sub>2</sub> représente un atome d'hydrogène ou un radical alkyle droit ou ramifié contenant 1 à 6 atomes de carbone,

X<sub>2</sub> et Y<sub>2</sub> représentent chacun un atome d'hydrogène ou forment ensemble avec l'atome de carbone auquel ils sont liés un groupement >C=O,

R<sub>3</sub> représente un radical alkyle contenant droit ou ramifié contenant 1 à 4 atomes de carbone éventuellement substitué par un radical hydroxy, alkoxy contenant 1 à 4 atomes de carbone, mercapto, alkylthio contenant 1 à 4 atomes de carbone, alkylsulfinyle contenant 1 à 4 atomes de carbone ou alkylsulfonyle contenant 1 à 4 atomes de carbone, étant entendu que, lorsque R<sub>3</sub> représente un radical alkyle substitué par un radical hydroxy, R<sub>3</sub> peut former avec le radical carboxy en α une lactone,

R'<sub>3</sub> représente un atome d'hydrogène ou un radical alkyle droit ou ramifié contenant 1 à 6 atomes de carbone,

X représente un atome d'oxygène ou de soufre, et

R représente un atome d'hydrogène ou un radical alkyle éventuellement substitué par un radical alkoxy contenant 1 à 4 atomes de carbone, alkylthio contenant 1 à 4 atomes de carbone, alkylsulfinyle contenant 1 à 4 atomes de carbone, alkylsulfonyle contenant 1 à 4 atomes de carbone, phényle, phénoxy, phenylthio, phénylsulfinyle, phénylsulfonyle, alkylamino contenant 1 à 4 atomes de carbone ou dialkylamino dont chaque partie alkyle contient 1 à 4 atomes de carbone, ou un radical phényle éventuellement substitué par un ou plusieurs atomes ou radicaux, identiques ou différents choisis parmi les atomes d'halogène et les radicaux alkyles, alkoxy, alkylthio ou alcanoyloxy contenant 1 à 4 atomes de carbone.

## 2 - Nouveaux peptides selon la revendication 1 pour lesquels

R<sub>1</sub> représente un radical de formule Y-S-A<sub>1</sub>- dans lequel Y représente un atome d'hydrogène ou un reste lysine ou un reste d'acide gras contenant jusqu'à 20 atomes de carbone et A<sub>1</sub> représente un radical éthylène ou propylène éventuellement substitué par un radical amino,

X<sub>1</sub> et Y<sub>1</sub> représentent chacun un atome d'hydrogène ou forment ensemble avec l'atome de carbone auquel ils sont liés un groupement >C=O,

R<sub>2</sub> représente un radical isopropyle, méthyl-1 propyle, tert-butyle ou cyclohexylméthyle,

R'<sub>2</sub> représente un atome d'hydrogène ou un radical méthyle,

X<sub>2</sub> et Y<sub>2</sub> représentent chacun un atome d'hydrogène ou forment ensemble avec l'atome de carbone auquel ils sont liés un groupement >C=O,

R<sub>3</sub> représente un radical méthyle ou éthyle substitué par un radical hydroxy, méthoxy, mercapto, méthylthio, méthylsulfinyle ou méthylsulfonyle,

R'<sub>3</sub> représente un atome d'hydrogène ou un radical méthyle,

X représente un atome d'oxygène, et

R représente un atome d'hydrogène ou un radical alkyle contenant 1 à 4 atomes de carbone éventuellement substitué par un radical alcoxy, ou un radical phényle.

3 - Nouveaux peptides selon la revendication 1 pour lesquels

5 R<sub>1</sub> représente un radical de formule Y-S-A<sub>1</sub>- dans lequel Y représente un atome d'hydrogène et A<sub>1</sub> représente un radical éthylène ou propylène éventuellement substitué par un radical amino,

X<sub>1</sub> et Y<sub>1</sub> représentent chacun un atome d'hydrogène ou forment ensemble avec l'atome de carbone auquel ils sont liés un groupement >CO,

10 R<sub>2</sub> représente un radical isopropyle, méthyl-1 propyle, tert-butyle ou cyclohexyl-méthyle,

R'<sub>2</sub> représente un atome d'hydrogène,

X<sub>2</sub> et Y<sub>2</sub> représentent chacun un atome d'hydrogène ou forment ensemble avec l'atome de carbone auquel ils sont liés un groupement >C=O,

15 R<sub>3</sub> représente un radical méthyle ou éthyle substitué par un radical hydroxy, méthoxy, mercapto ou méthylthio,

R'<sub>3</sub> représente un atome d'hydrogène, et

R représente un atome d'hydrogène ou un radical alkyle contenant 1 à 4 atomes de carbone.

20 4 - Nouveaux peptides selon la revendication 1 pour lesquels R<sub>1</sub> représente un radical mercapto-2 éthyle ou amino-1 mercapto-2 éthyle, X<sub>1</sub> et Y<sub>1</sub> représentent chacun un atome d'hydrogène ou forment ensemble avec l'atome de carbone auquel ils sont liés un groupement >CO, R<sub>2</sub> représente un radical isopropyle, X<sub>2</sub> et Y<sub>2</sub> représentent chacun un atome d'hydrogène ou forment ensemble avec l'atome de  
25 carbone auquel ils sont liés un groupement >C=O, R'<sub>2</sub> représente un atome d'hydrogène, R<sub>3</sub> représente un radical méthylthio-2 éthyle ou méthylsulfinyle-2 éthyle, R'<sub>3</sub> représente un atome d'hydrogène et R représente un atome d'hydrogène.

5 - Composition pharmaceutique caractérisée en ce qu'elle contient une  
30 quantité suffisante d'un peptide selon l'une des revendications 1 à 4 en association avec un ou plusieurs diluants ou adjuvants pharmaceutiquement acceptables inertes ou physiologiquement actifs.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No  
PC1/FR 96/00199

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER  
IPC 6 C07K5/103 A61K38/07

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)  
IPC 6 C07K A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	EP,A,0 618 221 (SQUIBB BRISTOL MYERS CO) 5 October 1994 see claims; examples ---	1-5
A	EP,A,0 523 873 (MERCK & CO INC) 20 January 1993 see claims; examples ---	1-5
A	WO,A,91 16340 (UNIV TEXAS) 31 October 1991 cited in the application see claims; examples ---	1-5
A	WO,A,94 26723 (GENENTECH INC ;UNIV TEXAS (US); MARSTERS JAMES C JR (US); BROWN MI) 24 November 1994 see claims; examples ---	1,5
	-/--	

Further documents are listed in the continuation of box C.

Patent family members are listed in annex.

\* Special categories of cited documents :

- \*A\* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- \*E\* earlier document but published on or after the international filing date
- \*L\* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- \*O\* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- \*P\* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- \*T\* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- \*X\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- \*Y\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- \*&\* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

31 May 1996

Date of mailing of the international search report

27.06.96

Name and mailing address of the ISA  
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax (+ 31-70) 340-3016

Authorized officer

Fuhr, C

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/FR 96/00199

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P, X	WO,A,95 25092 (MERCK & CO INC ;DESOLMS S JANE (US); GRAHAM SAMUEL L (US)) 21 September 1995 see claims; examples -----	1-5

1

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/FR 96/00199

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP-A-0618221	05-10-94	AU-B- 5918494	06-10-94
		CA-A- 2118985	03-10-94
		CN-A- 1098408	08-02-95
		CZ-A- 9400690	18-01-95
		FI-A- 941519	03-10-94
		HU-A- 68080	29-05-95
		JP-A- 7089935	04-04-95
		NO-A- 941181	03-10-94
		NZ-A- 260137	27-02-96
		ZA-A- 9401902	14-10-94
EP-A-0523873	20-01-93	CA-A- 2072033	29-12-92
		JP-A- 6157589	03-06-94
WO-A-9116340	31-10-91	US-A- 5141851	25-08-92
		AU-B- 637497	27-05-93
		AU-B- 7694691	11-11-91
		CA-A- 2076652	19-10-91
		DE-T- 528820	29-06-95
		EP-A- 0528820	03-03-93
		US-A- 5420245	30-05-95
WO-A-9426723	24-11-94	AU-B- 6909194	12-12-94
		CA-A- 2160786	24-11-94
		EP-A- 0698015	28-02-96
WO-A-9525092	21-09-95	US-A- 5439918	08-08-95
		AU-B- 1988495	03-10-95



# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Dema<sup>n</sup> Internationale No  
PCT/FR 96/00199

**A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE**  
CIB 6 C07K5/103 A61K38/07

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

**B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE**

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)  
CIB 6 C07K A61K

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si cela est réalisable, termes de recherche utilisés)

**C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS**

Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	EP,A,0 618 221 (SQUIBB BRISTOL MYERS CO) 5 Octobre 1994 voir revendications; exemples ---	1-5
A	EP,A,0 523 873 (MERCK & CO INC) 20 Janvier 1993 voir revendications; exemples ---	1-5
A	WO,A,91 16340 (UNIV TEXAS) 31 Octobre 1991 cité dans la demande voir revendications; exemples ---	1-5
A	WO,A,94 26723 (GENENTECH INC ;UNIV TEXAS (US); MARSTERS JAMES C JR (US); BROWN MI) 24 Novembre 1994 voir revendications; exemples ---	1,5
	-/--	

Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents

Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

\* Catégories spéciales de documents cités:

- \*A\* document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- \*E\* document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
- \*L\* document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)
- \*O\* document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
- \*P\* document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

- \*T\* document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention
- \*X\* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément
- \*Y\* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier
- \*A\* document qui fait partie de la même famille de brevets

1

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée  <b>31 Mai 1996</b>	Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale  <b>27. 06. 96</b>
Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax (+ 31-70) 340-3016	Fonctionnaire autorisé  <b>Fuhr, C</b>

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demr Internationale No  
PCT/FR 96/00199

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
P,X	WO,A,95 25092 (MERCK & CO INC ;DESOLMS S JANE (US); GRAHAM SAMUEL L (US)) 21 Septembre 1995 voir revendications; exemples -----	1-5

1

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux nombres de familles de brevets

Déma: Internationale No  
PCT/FR 96/00199

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
EP-A-0618221	05-10-94	AU-B- 5918494	06-10-94
		CA-A- 2118985	03-10-94
		CN-A- 1098408	08-02-95
		CZ-A- 9400690	18-01-95
		FI-A- 941519	03-10-94
		HU-A- 68080	29-05-95
		JP-A- 7089935	04-04-95
		NO-A- 941181	03-10-94
		NZ-A- 260137	27-02-96
ZA-A- 9401902	14-10-94		
-----			
EP-A-0523873	20-01-93	CA-A- 2072033	29-12-92
		JP-A- 6157589	03-06-94
-----			
WO-A-9116340	31-10-91	US-A- 5141851	25-08-92
		AU-B- 637497	27-05-93
		AU-B- 7694691	11-11-91
		CA-A- 2076652	19-10-91
		DE-T- 528820	29-06-95
		EP-A- 0528820	03-03-93
		US-A- 5420245	30-05-95
-----			
WO-A-9426723	24-11-94	AU-B- 6909194	12-12-94
		CA-A- 2160786	24-11-94
		EP-A- 0698015	28-02-96
-----			
WO-A-9525092	21-09-95	US-A- 5439918	08-08-95
		AU-B- 1988495	03-10-95
-----			

***This Page Blank (uspto)***